

# Efek Fraksi Air Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Terhadap Imunitas Alami Tikus Wistar Jantan

Wahyu Dewi Tamayanti<sup>(a)\*</sup>, Lisa Soegianto<sup>(a)</sup>, Elisabeth Nurak<sup>(a)</sup>, Lannie Hadisoewignyo<sup>(a)</sup>, Martha Ervina<sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup>Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

Pemberian fraksi air daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap jumlah netrofil dan kadar IL-6 tikus Wistar jantan yang telah diinduksi *Staphylococcus aureus* telah dilakukan. Tikus Wistar jantan dibagi dalam 3 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus, yaitu kelompok kontrol negatif (perlakuan NaCl 0,9%), kelompok uji (perlakuan fraksi air daun salam 200 mg/kg BB) dan kelompok kontrol positif (perlakuan suspensi ibuprofen 400 mg/kg BB). Tikus dengan perlakuan dikorbankan satu jam setelah induksi *Staphylococcus aureus*, dan diambil darahnya. Perhitungan jumlah netrofil darah dilakukan di bawah mikroskop dan penentuan kadar IL-6 dilakukan dengan metode ELISA. Hasil analisa data dengan anava satu arah mengindikasikan bahwa daun salam tidak menurunkan jumlah netrofil darah maupun IL-6 pada tikus Wistar jantan yang terinduksi *Staphylococcus aureus*.

**Kata Kunci:** netrofil, IL-6, daun salam (*Syzygium polyanthum*), ibuprofen.

## Effect of *Syzygium Polyanthum* Water Fraction in the Innate Immunity of Male Wistar Rats

The effect of *Syzygium polyanthum* (SP) water fraction in the innate immunity of male Wistar rats with *Staphylococcus aureus* (SA) induced have been conducted. Fifteen Wistar rats were divided into 3 groups of five; negative control group (treated by 0.9 % NaCl); treatment group (treated by SP water fraction 200 mg/kg BW); and positive control group (treated by ibuprofen 400 mg/kg BW). The treated rats were terminated an hour after SA induction. Neutrophils was measured under light microscope and IL-6 level was analyzed by ELISA. The statistical analysis indicated that SP water fraction does not decrease number of neutrophils and IL-6 level on SA-induced male Wistar rats.

**Keywords:** neutrophils, IL-6, bay leaf (*Syzygium polyanthum*), ibuprofen



## PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan suatu respons protektif normal tubuh terhadap gangguan jaringan oleh trauma fisik, senyawa kimia, atau zat-zat mikrobiologis. Inflamasi juga merupakan respons awal dari sistem imun terhadap infeksi mikroba yang dapat mengganggu jaringan. Inflamasi sering dianggap sebagai reaksi yang merugikan tubuh, namun sebenarnya inflamasi merupakan respons protektif yang sangat diperlukan tubuh sebagai upaya mengembalikan keadaan jaringan yang terganggu menuju kondisi awal (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Respon inflamasi dapat terjadi dalam tiga fase: (1) fase akut, dikarakterisasi oleh vasodilatasi lokal dan peningkatan permeabilitas kapiler; (2) fase sub-akut, dikarakterisasi oleh infiltrasi leukosit dan fagositosis sel; dan (3) fase kronik proliferasi, di mana terjadi degradasi dan fibrosis pada jaringan. Gejala yang timbul yaitu *calor* (panas), *dolor* (nyeri), *rubor* (merah), *tumor* (bengkak) dan *functio laesa* (kehilangan fungsi). Inflamasi dapat disebabkan antara lain oleh histamin, serotonin, 5-HT, leukotrien, bradikinin dan prostaglandin. Selain itu inflamasi juga dapat diinduksi oleh mediator lainnya yaitu *Tumor Necrotic Factor alfa* (TNF- $\alpha$ ) dan *Nitrit Oxida* (NO) (Cunnick *et al.*, 2009).

Antiinflamasi adalah senyawa yang dapat mengurangi atau menekan inflamasi dengan menghambat pelepasan mediator-mediator inflamasi. Obat antiinflamasi yaitu obat-obat golongan *Non Steroid Antiinflammatory Drugs* (NSAIDs), salah satunya ibuprofen, yang merupakan NSAIDs turunan asam propionat dan berfungsi sebagai antiinflamasi melalui penghambatan pembentukan COX-1 dan COX-2 (Katzung, 2009). Sebagai alternatif NSAIDs, digunakan senyawa dari alam yang beraktivitas antiinflamasi, salah satunya daun salam. Salam (*Syzygium polyanthum*, Myrtaceae) merupakan tanaman obat Indonesia yang komponen fenoliknya telah diidentifikasi memiliki kemampuan sebagai reduktor sehingga dapat menetralkan radikal bebas (Javanmardi *et al.*, 2003).

Penelitian terhadap kandungan dan khasiat daun salam telah banyak dilakukan salah satunya oleh Giri (2008). Dalam penelitiannya, diberikan serbuk daun salam kering 2,04 g/kg BB dan diuji efek antioksidannya pada tikus hiperglikemia dan hiperglikemia-hiperkolesterolemia. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa efek antioksidan daun salam terlihat pada tikus yang mengalami hiperglikemia-hiperkolesterolemia. Efek antioksidan tersebut diduga karena adanya kandungan 5 macam golongan senyawa, yaitu saponin, terpen, steroid, tanin, dan flavonoid sebagai hasil uji fitokimia dari ekstrak daun salam (Giri, 2008). Hal ini mendukung laporan mengenai flavonoid yang telah terbukti sebagai antioksidan untuk mencegah pembentukan radikal bebas (Sunarni *et al.*, 2007). Penelitian lain oleh Ngestiningsih (2011) mengatakan bahwa daun salam berpotensi menurunkan inflamasi. Dalam penelitiannya menggunakan 3 simplisia: daun salam (*Syzygium polyanthum*) 43,4%, seledri

(*Avium graveolens*) 33,3%, biji jinten hitam (*Nigella sativa*) 23,33% telah dibuktikan dapat menurunkan kadar asam urat pasca pemberian ekstrak herbal disertai penurunan kadar TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IL-1 $\beta$ . Hadisoewigno (2012) juga melakukan pengujian efek antiinflamasi fraksi air daun salam 200 mg/kg BB pada tikus Wistar jantan. Penelitian tersebut melaporkan bahwa fraksi air daun salam menghambat edema pada telapak kaki tikus dengan persen inhibisi 54,76%. Pengujian aktivitas antioksidan daun salam juga dilakukan dengan hasil nilai IC<sub>50</sub> 18,74  $\mu$ g/ml daun salam yang mengklasifikasikan daun salam sebagai antioksidan kuat, sekalipun masih di bawah quersetin dengan IC<sub>50</sub> 6,23  $\mu$ g/ml (Hadisoewigno *et al.*, 2012).

Penelitian-penelitian seputar khasiat daun salam sebagai antioksidan dan antiinflamasi akan semakin lengkap bila didukung dengan penelitian mengenai aktivitasnya terhadap imunitas alami seperti monosit, eosinofil, makrofag dan netrofil. Penelitian ini melaporkan tentang hasil uji efek pemberian fraksi air daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap imunitas alami tikus Wistar jantan dengan parameter jumlah netrofil dan Interleukin 6 (IL-6).

## METODE PENELITIAN

Daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang digunakan telah dideterminasi di UPT Materia Medika Batu, Jatim. Tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) berusia 2-3 bulan, 150-200 gram dibagi menjadi 3 kelompok (kelompok kontrol diberi NaCl 0,9%; kelompok perlakuan diberi fraksi air daun salam 200 mg/kg BB; dan kelompok kontrol positif mendapat ibuprofen 400 mg/kg BB). Sebelum perlakuan oral, tikus diadaptasi selama satu minggu untuk diamati kondisi umum, berat badan, dan tingkah lakunya. Hewan yang tidak menunjukkan gejala sakit dan tidak terjadi penurunan berat badan melebihi 10% dari berat badan awal digunakan dalam penelitian.

### Standarisasi Simplisia dan Ekstrak

Standarisasi dilakukan sesuai Depkes RI, 2000 untuk menentukan kadar abu, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol simplisia dan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*). Skrining fitokimia dilakukan berdasarkan Farnstwood (1966) untuk mengetahui kandungan di dalam ekstrak dan fraksi air daun salam.

### Ekstraksi dan Fraksinasi Ekstrak

Pembuatan ekstrak secara maserasi dengan etanol 96% dilakukan untuk memperoleh ekstrak kental yang kemudian ditambahkan 50 ml metanol-air (7:3) dan 100 ml *n*-heksana untuk menarik senyawa kandungan yang bersifat non polar. Proses tersebut dilakukan sampai cairan *n*-heksana yang ditambahkan menjadi jernih. Setelah jernih ekstrak yang tersisa ditambahkan dengan 50 mL metanol-air kemudian ditambahkan 100 mL etil asetat untuk menarik senyawa semi polar. Sisa ekstrak tidak terlarut dari proses fraksinasi dengan etil asetat dikumpulkan dalam cawan dan diencerkan dengan metanol untuk



TABEL 1. Hasil Standarisasi Simplisia Daun Salam

Parameter	Hasil	Pustaka (Depkes RI, 2000)
Kadar abu	5,69 ± 0,09	≤5%
Kadar sari larut air	5,45 ± 0,24	≥12%
Kadar sari larut etanol	11,55 ± 0,03	≥8%

TABEL 2. Hasil Uji Standarisasi Ekstrak

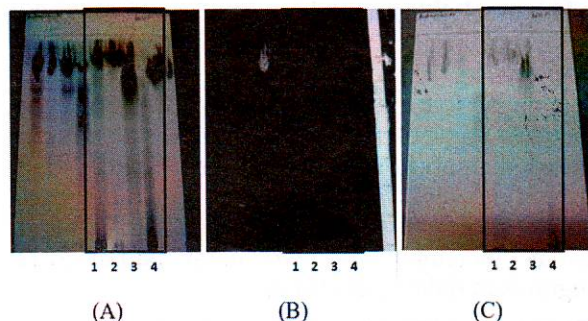
Bahan Uji	Organoleptis
Ekstrak Daun Salam	Warna : coklat tua
	Rasa : tidak berasa
	Bau : khas
	pH : 5,0
	Kadar abu : 1,85 ± 0,07 Kadar air : 21,15 ± 1,20

TABEL 3. Hasil Uji Skrining Fitokimia

Golongan	Kriteria Berdasarkan Farnsworth (1966)	Hasil
Flavonoid	Terbentuk warna merah	(+)
Alkaloid	Terbentuk endapan jingga dengan pereaksi Dragendorf	(-)
Kuinon	Terbentuk warna merah	(+)
Tanin	Terbentuk warna hijau	(+)
Saponin	Terbentuk busa yang stabil	(-)
Sterol/terpen	Terbentuk warna merah-hijau	(+)

TABEL 4. Rerata Perhitungan Netrofil dan IL-6

Kelompok	Neutrofil (Sel/Lapangan Pandang)	IL-6 (pg)
Kontrol negatif	0,84 ± 0,33	84,19 ± 13,86
Kontrol positif	1,34 ± 0,39	21,77 ± 26,89
Daun Salam	0,92 ± 0,57	102,16 ± 198,22



Gambar 1. Profil KLT ekstrak dan fraksi herba sambiloto dan daun salam.

**Keterangan :** (A) pengamatan pada UV 254 nm, (B) pengamatan pada UV 366 nm, (C) Pengamatan setelah reaksi dengan uap amoniak: (1) = ekstrak total daun salam, (2) = fraksi n-heksana daun salam, (3) = fraksi etil asetat daun salam, (4) = fraksi air daun salam dengan fase diam silika gel dan fase gerak butanol : asam asetat : air = 3:1:1.

diuapkan. Perlakuan untuk proses pemisahan tetap sama menggunakan corong pisah. Sampai pada akhirnya didapat 3 macam fraksi yaitu fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air (Hayati *et al.*, 2010).

#### Penentuan Jumlah Netrofil dan IL-6

Tikus coba yang telah dipuasakan selama 18 jam diinduksi *Staphylococcus aureus* (Wasito, *et al.*, 2008). Satu jam setelah induksi, tikus dieutanasia, dibedah dan diambil darah dari jantung. Sebagian darah segera dibuat hapusan. Preparat hapusan darah diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali untuk dihitung jumlah sel

netrofil. Sebagian pada tabung ber-EDTA disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, lalu diambil supernatannya untuk diuji kadar IL-6 menggunakan *ELISA reader* (Kusmardi *et al.*, 2006).

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan daun salam (*Polyanthi Folium*) yang telah dideterminasi dan diproses sampai menjadi serbuk simplisia kering oleh UPT Materia Medika, Batu, Malang. Serbuk simplisia distandardisasi dengan melakukan uji kadar abu, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol untuk menguji kelayakannya sebelum digunakan dalam penelitian. Penetapan kadar abu menunjukkan nilai kadar abu serbuk simplisia daun salam sebesar (5,69±0,09%) tidak memenuhi persyaratan (Depkes, 2000). Hal ini diduga terjadi karena kurang optimalnya kondisi pada proses pencucian sehingga zat-zat pengotor masih ada yang tersisa dan menyebabkan nilai kadar abu lebih tinggi dari yang dipersyaratkan. Sementara itu, hasil uji kadar sari larut air daun salam (5,49±0,24%) tidak memenuhi persyaratan (Depkes RI, 2000) diduga karena proses penguapan kurang optimal oleh karenanya, sebelum penyimpanan ekstrak sebaiknya dilakukan penguapan kembali dan diuji kadar air sampai memenuhi persyaratan. Hal lain yang dapat menyebabkan kadar air melebihi persyaratan adalah adanya penguapan minyak atsiri pada saat proses pengujian.

Hasil uji kadar sari larut etanol daun salam (11,55±0,03%) sudah memenuhi persyaratan (Depkes RI, 2000). Berdasarkan hasil tersebut, maka pada proses ekstraksi digunakan pelarut etanol. Skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam daun salam (**Tabel 3**) menunjukkan bahwa daun salam yang digunakan mengandung flavonoid, tanin, kuinon dan sterol/ terpen. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya, bahwa daun salam mengandung flavonoid dan tanin (Sumono dan Wulan, 2008). Flavonoid diduga kuat merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antiinflamasi (Sunarni *et al.*, 2007; Widyawati, 2007). Ekstrak lalu difraksinasi, dan dari hasil fraksinasi diidentifikasi senyawa flavonoidnya dengan menggunakan plat KLT yang dieluasi dengan larutan pengembang butanol: asam asetat : air (3:1:1) yang kemudian dievaluasi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, setelah itu direaksikan dengan uap amoniak. Hasil KLT fraksi daun salam (**Gambar 1**) menunjukkan positif adanya kandungan senyawa yang diduga golongan flavonoid dengan terbentuknya noda berwarna kuning coklat pada pengamatan sinar tampak setelah direaksikan dengan uap amoniak (Farnsworth, 1996).

Pada **Tabel 4** perhitungan jumlah netrofil darah yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna pada seluruh kelompok perlakuan. Hal ini diduga adanya migrasi netrofil menuju ke faktor-faktor kemoatraktan yang diproduksi oleh *Staphylococcus aureus* yang diinduksikan ke dalam cairan peritoneal.



Sel-sel imun non spesifik, seperti netrofil, berperan dalam keadaan normal diproduksi dan disimpan dalam sumsum tulang. Netrofil dalam keadaan normal terdapat dalam tubuh  $10^{10}$  sel per hari dan pada keadaan inflamasi akan meningkat sampai 10 kali lipat. Selain itu, pada keadaan inflamasi akut, netrofil dalam sirkulasi dapat meningkat dengan segera dari 5.000/ $\mu$ L sampai 30.000 / $\mu$ L (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Hal ini belum dapat dibuktikan pada penelitian ini.

Pengukuran kadar IL-6 dengan metode *Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)* pada panjang gelombang 450 nm menunjukkan bahwa kadar IL-6 pada kelompok daun salam memiliki rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Secara statistik kadar IL-6 pada kelompok perlakuan jauh lebih tinggi dari kelompok kontrol positif. Hal ini diduga karena IL-6, sitokin yang berperan pada inflamasi akut oleh bakteri dan mikroba, terekresi dalam kadar optimal pada 1 jam pasca induksi SA. Hal ini untuk memfasilitasi koordinasi sistem imun tubuh saat

terjadi infeksi akut. Pada kondisi tersebut, IL-6 menginduksi ekspresi molekul adhesi pada sel endotel sehingga leukosit lebih mudah menempel pada dinding endotel untuk memfasilitasi terjadinya diapedesis yang kemudian akan meningkatkan jumlah lekosit yang bermigrasi menuju lokasi infeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2012).

Kondisi peningkatan kadar IL-6 pada penelitian ini disertai dengan sedikitnya jumlah netrofil per lapangan pandang menunjukkan bahwa makrofag pada area peritoneal telah melakukan aktivitasnya dalam mengenali dan berusaha melakukan koordinasi untuk merekrut sistem alamiah lain dari sirkulasi darah menuju tempat infeksi dengan melepaskan sitokin pro inflamasi, yaitu IL-6 (Lichtman *et al.*, 2007). Netrofil merupakan lekosit yang diduga banyak bermigrasi menuju peritoneal sehingga jumlahnya dalam darah menurun.

## KESIMPULAN

Fraksi air daun salam meningkatkan jumlah netrofil dan IL-6 dalam darah tikus Wistar jantan yang diinduksikan *Staphylococcus aureus*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2000, **Parameter Standard Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta, 1 -3.
- Abbas KA, Lichtman AH, dan Pillai S, 2007, **Celular and Molecular Immunology**, 6<sup>th</sup> ed., ELSEVIER, Philadelphia, 3-7, 27.
- Anonim, 2009, Module 1 The Laboratory Rat, Handling and Restraint, In: McGill. Backer, CA, Brink, RCBVD, 1963, **Flora of Java**, Vol. 1, Noordhoff Groningen-The Netherlands.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2005, **Kriteria dan Tata Laksana Pendaftaran Tradisional, Obat Herbal Terstandar dan Fitofarmaka**, Bahan Pengawas Obat dan Makanan RI, Jakarta, 59.
- Baratawidjaja KG dan Rengganis I, 2010, **Imunologi Dasar**, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Cunnick JA, Zhai Z, Solco A, Wu L, Wurtele ES, Kohut ML, Murphy PA, 2009, Echinacea Increase Arginase Activity and Has Antiinflammatory Properties in RAW 264.7 Macrophage Cells, Indicate of Alternative Macrophage Activation, **J Ethnopharmacol**, 122, 76-85.
- Farnsworth NR, 1966, Biological and Phytochemical Screening of Plants, **J Pharm Sci**, 55, 225-276.
- Farnsworth NR, Henry LK, Svoboda GH, Blomster RN, Yates MJ, dan Euler KL, 1966, Biological and Phytochemical Evaluation of Plants. I. Biological Test Procedures and Result From Two Hundred Accessions, **Lloydia**, 29, 01 - 122.
- Giri LN, 2008, Potensi Antioksidan Daun Salam: Kajian *In Vivo* Pada Tikus Hiperkolesterolemia dan Hiperlipidemia, **Skripsi Sarjana**, IPB, Bogor, p. 26-27.
- Hadisoewignyo L, Ervina M, Theodora I, dan Soegianto L, 2012, **Aktivitas Antioksidan, Antiinflamasi dan Uji Ulserogenik Kombinasi Ekstrak Sambiloto dan Ekstrak Daun Salam yang Berkhasiat Sebagai Antidiabetes**, Unpublished Research, Unika Widya Mandala, Surabaya.
- Hayati KE, Fasyah GA, dan Sa'adah L, 2010, Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), **J Kimia**, 4(2), 193-200.
- Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, dan Vivanco JM, 2003, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Iranian Ocimum* Accessions, **J Food Chem**, 83, p. 547-550.
- Kusmardi, Kumala S, Wulandari D, 2006, Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) Terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag, **Makara Kesehatan**, 10(2), 89-93.
- Ngestiningsih D dan Hadi S, 2011, **Ekstrak Herbal (Daun Salam, Jintan Hitam, Daun Seledri) dan Kadar IL-6 Plasma Penderita Hiperurisemia**.
- Sumono, A and Wulan, A, 2008, The Use of Bay Leaf (*Eugeniapolyantha* Wight) in Dentistry, **Dental Journal, Majalah Kedokteran Gigi**, No. 3, Vol. 41, p. 147-15.
- Sunarni T, Pramono S, dan Asmah R, 2007, Flavonoid Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.), **Majalah Farmasi Indonesia**, 18(3), 111-116.
- Wijayakusuma H, 1996, **Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia, Jilid IV, Cetakan pertama**, Penerbit Pustaka Kartini, VII, 137-138.
- Winter CA, 1964, Antiinflammatory Testing Methods: Comparative Evaluation of Indomethacine and Other Agent. **International Congress Series Excepta Medica Foundation**, 82, 190-200.